

47



REPUBLIK  
ÖSTERREICH  
Patentamt

(10) Nummer: **AT 409 379 B**

(12)

## PATENTCHRIFT

(21) Anmeldenummer: 1659/99  
(22) Anmeldetag: 28.09.1999  
(42) Beginn der Patentdauer: 15.12.2001  
(45) Ausgabetag: 25.07.2002

(51) Int. Cl.<sup>7</sup>: **C12N 5/00**

(30) Priorität:  
02.06.1999 AT A 985/99 beansprucht.

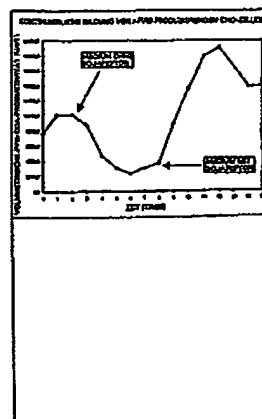
(56) Entgegenhaltungen:  
JP 7039386A JP 5123178A JP 3244391A  
WO 96/26266A1 RD 415051A WO 98/15614A1  
WO 91/10726A1 JP 91/07955

(73) Patentinhaber:  
BAXTER AKTIENGESELLSCHAFT  
A-1221 WIEN (AT).

(54) MEDIUM ZUR PROTEIN- UND SERUMFREIEN KULTIVIERUNG VON ZELLEN

AT 409 379 B

(57) Beschrieben wird ein Medium zur protein- und serumfreien Kultivierung von Zellen, insbesondere Säugtierzellen, das einen Anteil an Soja-Hydrolysat enthält.



Die Erfindung betrifft ein Medium zur protein- und serumfreien Kultivierung von Zellen.

Die Kultivierung von Zellen, insbesondere von eukaryontischen Zellen bzw. Säugetierzellen, bedingt stets den Einsatz spezieller Kultivierungsmedien, die den Zellen die für ein effizientes Wachstum und Produktion der erwünschten Proteine erforderlichen Nähr- und Wachstumsstoffe zur Verfügung stellt. In der Regel wird hierbei als Mediumkomponente Serum oder aus Serum abgelei-

5 tete Verbindungen eingesetzt (z.B. bovines Serum).  
Bei der Verwendung von Serum in Zellkulturen bzw. von Proteinadditiven, die aus menschlichen oder tierischen Quellen abgeleitet sind, existieren allerdings zahlreiche Probleme, vor allem, wenn mit der Zellkultur Ausgangsmaterial für die Herstellung eines Arzneimittels, das am Men-

10 schen verabreicht werden soll, zur Verfügung gestellt wird.  
So variiert die Zusammensetzung und die Qualität bei solchen Serumpräparaten alleine schon auf Grund der Verschiedenheit der Spenderorganismen für derartige Präparate von Charge zu Charge. Dies stellt vor allem bei der Standardisierung der Zellproduktion und bei der Etablierung von Standardzuchtbedingungen für derartige Zellen ein erhebliches Problem dar. In jedem Fall ist

15 aber eine intensive und ständige Qualitätskontrolle des eingesetzten Serummaterials erforderlich. Dies ist aber speziell bei derartig komplexen Zusammensetzungen wie Serum äußerst aufwendig und kostenintensiv.  
Weiters enthalten solche komplexen Präparate eine Vielzahl von Proteinen, die vor allem im Zuge des Aufreinigungsprozesses des zu gewinnenden rekombinanten Proteins aus der Zellkultur

20 störend wirken können. Dies gilt vor allem für diejenigen Proteine, welche dem zu gewinnenden Protein homolog oder ähnlich sind. Naturgemäß sind diese Probleme vor allem bei der rekombinanten Gewinnung von Serumproteinen akut, da das biogene Pendant im eingesetzten Medium (z.B. etwa das bovine Protein) im Zuge der Aufreinigung nur verlässlich durch ganz spezifische differenzielle Reinigung (z.B. mit Antikörpern, die spezifisch nur auf das rekombinante Protein,

25 nicht jedoch auf das bovine gerichtet sind, entfernt werden kann (Björck L., J. Immunol., 1988, Vol 140, pp. 1194-1197; Nilson et al., J. Immunol Meth., 1993, 164, pp. 33-40).  
Ein entscheidendes Problem bei der Verwendung von Serum oder aus Serum abgeleiteten Verbindungen im Kulturmedium ist aber auch das Risiko an Kontamination mit Mycoplasmen, Viren oder BSE-Agenzien. In Zusammenhang mit aus menschlichem Blut abgeleiteten Präparaten ist

30 hierbei das Risiko der Kontamination mit Viren, wie Hepatitis oder HIV, besonders hervorzuheben. Bei aus bovinem Material abgeleitetem Serum oder Serumkomponenten besteht vor allem die Gefahr einer BSE-Kontamination. Darüberhinaus können sämtliche Serum-abgeleiteten Materialien auch mit Krankheitserregern die noch unbekannt sind kontaminiert sein.  
Gerade aber für die Kultivierung von Zellen an festen Oberflächen wurde die Zugabe von Se-

35 rumkomponenten zur Gewährleistung einer ausreichenden Haftung der Zellen an den Oberflächen und einer ausreichenden Produktion an den erwünschten Substanzen aus den Zellen bis auf wenige Ausnahmen bislang als unumgänglich angesehen worden. So konnte zwar beispielsweise mit dem in der WO 91/09935 beschriebenen Methodik ein Verfahren zur serum- und protein-

40 freien Kultivierung von FSME-Virus/Virusantigenen durch serum- und proteinfreie Kultivierung von Oberflächen-abhängigen permanenten Zellen, vorzugsweise Verozellen, erreicht werden (s. WO 98/15231). Es handelte sich dabei jedoch nicht um rekombinante Zellen, sondern um Wirtszellen, die für die Produktion von Virusantigenen in einem lytischen Prozeß eingesetzt werden.

Im Gegensatz dazu sind die vorrangig für die rekombinante Herstellung eingesetzten Zellen, beispielsweise CHO-Zellen, nur bedingt haftungsfähig. So können mittels konventioneller Metho-

45 den angezogene CHO-Zellen nur unter serumhaltigen Bedingungen sowohl an glatte als auch an poröse Mikroträger binden (s. US 4,978,616; Cytotechnology 9 (1992), 247-253). Werden aber derartige Zellen unter serumfreien Bedingungen angezogen, so verlieren sie diese Eigenschaft und haften nicht an glatten Trägern oder lösen sich leicht von diesen ab, sofern nicht andere Adhärenz-fördernde Zusätze, wie beispielsweise Fibronectin, Insulin oder Transferrin im Medium vorge-

50 sehen werden. Auch hierbei handelt es sich jedoch um aus Serum abgeleitete Proteine.  
Alternativ dazu können die Zellen zwar auch in Suspensionskultur gezogen werden, beispielsweise im Batch-Verfahren oder in einer kontinuierlichen Kultur. Bevorzugterweise erfolgt die Kultivierung im Chemostat-Verfahren (Ozturk S.S. et al., 1996, Abstr.Pap.Am.Chem.Soc., BIOT 164; Payne G.F. et al., in "Large Scale Cell Culture Technology", 1987, ed. Lydersen B.K., Hauser

55 publishers, S.206-212).

Die JP 7-39386 betrifft ein Verfahren zur Herstellung von Zellulose, wobei Mikroorganismen aus der Familie Acetobacter, die die Fähigkeit zur Produktion von zelluloseartigen Substanzen haben, in Kulturmedium kultiviert werden, dem Carbonsäuren oder deren Salze als Zellulosewachstum fördernde Faktoren zugesetzt werden, um die Produktivität der Zellen zu steigern. Als Bestandteile der Kultivierungsmedien werden u.a. Petaton und Hefeextrakt angegeben. Dieser Stand der Technik ist beschränkt auf die Zelluloseproduktion in Aceto-bacter-Kulturen.

Die JP 5-123178 beschreibt die Herstellung von Phenylalanin durch Einwirken von Mikroorganismen mit  $\beta$ -Tyrosinaseaktivität auf ein Medium, das Phenylalanin und Tyrosin enthält. Es wird betont, dass jegliche Fermentationslösung verwendet werden kann, die diese beiden Aminosäuren enthält, beispielsweise werden als Stickstoffquellen Fleischextrakt oder Pepton angegeben. Auch der Zusatz von Vitamin B6 erfolgt nur deshalb, um die  $\beta$ -Tyrosinaseaktivität zu erhöhen.

Die JP 3-244391 beschreibt die Verwendung von Bakterienzellen, i.e. Coli-Bakterien, zur Herstellung von rekombinanten Proteinen, wobei die Effizienz der Entfernung von aminoterminalen Methioninresten verbessert werden soll. Dazu werden spezielle Expressionsplasmide verwendet, die die Expression in *E.coli* ermöglichen. Gemäß diesem Dokument wird die Verwendung eines M9-Mediums empfohlen, dem anstelle der "Kasaminosäure" hydrolysiertes Sojaprotein zugegeben wird. Dieses Medium enthält außerdem auch Hefeextrakt.

Die WO 96/26266 beschreibt die Zugabe von Proteinhydrolysaten zu Medien für die Kultivierung von Zellen. Bei den angeführten Beispielen, die die Vorteilhaftigkeit der Zugabe der Proteinhydrolysate für die Expression von rekombinanten Proteinen in Zellkultur beschreiben sollen, wird aber stets u.a. fetales Kälberserum zum Basismedium zugesetzt.

Das RD 415 051 (Quest International) beschreibt die Zugabe von Peptid-Mischungen, darunter auch Sojapepton, zu Zellkulturmedien für die Kultivierung von eukaryontischen Zellen. Dies führt zu einem verstärkten Zellwachstum. Es wird betont, dass die Zugabe von Sojapepton zum Medium den Bedarf an Serum im Medium für die Kultivierung von BHK- und CHO-Zellen lediglich um 80% reduziert, nicht jedoch eliminiert.

Die WO98/15614 beschreibt die Zugabe von Zusatzstoffen aus Pflanzen in Zellkulturen tierischer Zellen. Dabei wird zwar ein serumfreies Medium verwendet, nicht aber ein proteinfreies Medium, wie die Passagen belegen, worin die Zugabe von EGF, Insulin, Transferrin oder Insulin für die Herstellung eines basalen Mediums, das für die weiteren Vergleichsversuche verwendet wird, beschrieben wird. Weiters wurde der Effekt der Zugabe von Pflanzen-Derivaten im Hinblick auf die Wachstumsrate der Zellen gemessen, nicht aber auf deren Produktivität.

Die WO91/10726 beschreibt Kulturmedium für die Kultivierung von Tumor- und Nicht-Tumor-Zellen, wobei hier das Ziel lediglich darin besteht, die Zellen zu kultivieren, nicht aber rekombinante Proteine mittels dieser Zellen herzustellen. Weiters wird hier ein Basalmmedium (PDRG) beschrieben, dem fetales Kälberserum zugesetzt wurde. Weiters wird dem Medium gemäß diesem Dokument eine Vielzahl von Aminosäuren zugegeben, nicht jedoch eine gezielte Auswahl weniger Aminosäuren.

Zudem wurde im Stand der Technik mehrfach versucht, Zellen ausgehend von serumhaltigen Bedingungen auf proteinfreies Medium zu adaptieren. Bei dieser Adaptierung wurde jedoch immer wieder festgestellt, dass die Ausbeute an exprimiertem Protein und die Produktivität der rekombinanten Zellen nach Adaption im proteinfreien Medium im Vergleich zu serumhaltigen Bedingungen stark absinkt (Appl.Microbiol.Biotechnol.40 (1994), S.691-658).

Es zeigt sich auch, dass bei hoher Zelldichte die Produktion an rekombinanten Proteinen zum Teil erheblich eingeschränkt ist. Beim Versuch der Adaptierung von Zellen an protein- oder serumfreien Medien kommt es auch immer wieder zu Instabilitäten unter reduziertem Wachstum der eingesetzten Zellen, so dass Zellen mit verringerter Expression oder auch nicht-produzierende Zellen entstehen, die gegenüber den produzierenden Zellen in protein- und serumfreien Medien einen Wachstumsvorteil haben, der dazu führt, dass diese die produzierenden Zellen überwuchern und letztendlich dann die ganze Kultur nur mehr sehr geringe Produktausbeuten liefert.

Die vorliegende Erfindung stellt sich daher zur Aufgabe, die Möglichkeiten zur protein- und serumfreien Kultivierung von rekombinanten Zellen zu verbessern und Mittel und Verfahren zur Verfügung zu stellen, mit welchen rekombinante Zellen in effizienter Weise serum- oder proteinfrei kultiviert werden können. Weiters soll damit die Kultivierung nicht nur von Oberflächenabhängigen Zellen möglich sein, sondern auch in Suspensionskultur, wobei Instabilitäten in der Produktivität

der Zellen möglichst hintangehalten werden sollen.

Ein weiteres Ziel der vorliegenden Erfindung liegt darüberhinaus auch in einer effizienten Produktionssteigerung der rekombinanten Zellen.

Schließlich soll erfindungsgemäß auch die Adaptierung von rekombinanten Zellen auf serum- und proteinfreie Medien verbessert und effizienter gestaltet werden können.

Diese Aufgaben werden erfindungsgemäß gelöst durch ein Medium zur protein- und serumfreien Kultivierung von Zellen, insbesondere von Säugetierzellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass es einen Anteil an Soja-Hydrolysat mit einem Molekulargewicht  $\leq 500$  Dalton enthält.

Überraschenderweise konnte gezeigt werden, dass die oben definierten Ziele durch das Kultivieren von Zellen in Soja-Hydrolysat-haltigem Medium erreicht werden können, ohne dass die im Stand der Technik beschriebenen Nachteile der serumfreien Kultivierung in Kauf genommen werden müßten. Es hat sich gezeigt, dass im Gegensatz zu anderen im Stand der Technik bekannten Hydrolysaten, wie etwa Weizen-, Rels- oder Hefehydrolysaten, nur das Soja-Hydrolysat die erfindungsgemäßen Eigenschaften vermittelt und beispielsweise zu einer signifikant erhöhten Ausbeute an rekombinatem Zielprotein führt.

Bevorzugterweise enthält das erfindungsgemäße Medium Soja-Hydrolysat in einer Menge von mehr als 10 Gew.-%, bezogen auf die Gesamttrockenmasse des Mediums. In der Regel wird das Soja-Hydrolysat in einer Menge von 4-40 % im Medium vorgesehen.

Erfindungsgemäß ist die Wahl des spezifischen Soja-Hydrolysats nicht kritisch. Eine Vielzahl von am Markt befindlichen Soja-Präparaten kann erfindungsgemäß eingesetzt werden, z.B. Peptone aus Sojamehl, enzymatisch verdaut (beispielsweise durch Papain), mit einem pH-Wert zwischen 6,5 und 7,5, einem Gesamtstickstoffgehalt zwischen 8% und 9,7% und einem Aschegehalt zwischen 8 und 15%. Es handelt sich dabei um Peptone aus Sojabohnen, wie sie im allgemeinen vom Fachmann für die Zellkultur verwendet werden.

Gemäß einer bevorzugten Ausführungsform wird im erfindungsgemäßen Medium eine gereinigte Präparation eines Soja-Hydrolysats bzw. einer Rohfraktion hiervon verwendet. Bei dieser Reinigung werden bevorzugterweise Verunreinigungen, die mit einer effizienten Kultivierung interferieren könnten, eliminiert oder aber die Definiertheit des Hydrolysats, beispielsweise hinsichtlich des Molekulargewichtes, verbessert.

Erfindungsgemäß besonders bewährt hat sich bei dieser Reinigung das Vorsehen eines Ultrafiltrationsschrittes, weshalb die Verwendung von ultrafiltriertem Soja-Hydrolysat im erfindungsgemäßen Medium besonders bevorzugt ist.

Die Ultrafiltration kann gemäß Verfahren erfolgen, wie sie im Stand der Technik ausführlich beschrieben sind, beispielsweise unter Verwendung von Membranfiltern mit definierter Ausschlussgrenze.

Die Reinigung des ultrafiltrierten Sojapeptons kann durch Gelchromatographie, beispielsweise mittels Sephadex-Chromatographie, beispielsweise Sephadex G25 oder Sephadex G10, oder äquivalente Materialien, Ionenaustauschchromatographie, Affinitätschromatographie, Größenausschlusschromatographie oder "reversed phase"-Chromatographie erfolgen. Es handelt sich dabei um Verfahren, wie sie dem Fachmann aus dem Stand der Technik bekannt sind.

Ein besonders vorteilhaftes Soja-Hydrolysat ist dadurch gekennzeichnet, dass es einen Gehalt an freien Aminosäuren zwischen 10,3 und 15,6%, bevorzugt zwischen 12 und 13,5%, einen Gesamtstickstoffgehalt zwischen 7,6 und 11,4%, bevorzugt zwischen 8,7 und 9,5%, und einen Endotoxin-Gehalt von  $< 500$  E/g aufweist, und dass mindestens 40%, bevorzugt mindestens 50%, besonders bevorzugt mindestens 55%, ein Molekulargewicht von 200-500 Dalton und mindestens 10%, bevorzugt mindestens 15%, ein Molekulargewicht von 500-1000 Dalton aufweisen. Ein derartiges Soja-Hydrolysat eignet sich besonders gut für die industrielle Produktion von rekombinanten Proteinen, da es auf Grund seiner Merkmale besonders leicht standardisierbar und in Routineverfahren einsetzbar ist.

Das erfindungsgemäße Medium kann neben Soja-Hydrolysat auch noch in an sich bekannter Weise synthetische Medien enthalten, wie beispielsweise DMEM/HAM's F12, Medium 199 oder RPMI, die aus der Literatur hinreichend bekannt sind.

Bevorzugterweise enthält das erfindungsgemäße Medium auch weitere Aminosäuren, vorzugsweise ausgewählt aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Glutamin oder Mischungen davon.

Vorzugsweise werden dem erfindungsgemäßen Medium zusätzlich folgende Aminosäuren zugegeben: L-Asparagin (In einer Menge von 0,001 bis 1 g/l Medium, bevorzugt 0,01 bis 0,05 g/l, besonders bevorzugt 0,015 bis 0,03 g/l), L-Cystein (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,005 bis 0,05 g/l, besonders bevorzugt 0,01 bis 0,03 g/l), L-Cystin (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,05 g/l, besonders bevorzugt 0,015 bis 0,03 g/l), L-Prolin (0,001 bis 1,5 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,07 g/l, besonders bevorzugt 0,02 bis 0,05 g/l), L-Tryptophan (0,001 bis 1 g/l, bevorzugt 0,01 bis 0,05 g/l; besonders bevorzugt 0,015 bis 0,03 g/l) und L-Glutamin (0,05 bis 1 g/l, bevorzugt 0,1 bis 1 g/l).

Die oben genannten Aminosäuren können dem erfindungsgemäßen Medium einzeln oder in Kombination zugesetzt werden. Besonders bevorzugt ist die kombinierte Zugabe der Aminosäure-Mischung enthaltend alle oben genannten Aminosäuren.

In einer besonderen Ausführungsform wird ein serum- und proteinfreies Medium verwendet, das zusätzlich eine Kombination der oben genannten Aminosäuremischung und gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton enthält.

Überraschenderweise hat sich gezeigt, dass, beispielsweise zur Inaktivierung von Viren oder anderen Pathogenen, das Medium ohne negative Effekte ca. 5 bis 20 Minuten, bevorzugt 15 Minuten, auf 70°C bis 95°C, bevorzugt 85 bis 95°C, erhitzt werden kann.

Erfindungsgemäß kann jedes bekannte synthetische Medium in Kombination mit Soja-Hydrolysat eingesetzt werden. Konventionelle synthetische Minimalmedien können anorganische Salze, Aminosäuren, Vitamine, eine Kohlehydratquelle und Wasser enthalten. Beispielsweise kann DMEM/HAM's F12-Medium eingesetzt werden. Der Gehalt an Sojaextrakt kann im Medium bevorzugterweise zwischen 0,1 und 100 g/l, besonders bevorzugt zwischen 1 und 5 g/l, liegen. Gemäß einer besonders bevorzugten Ausführungsform kann Sojapepton, das hinsichtlich seines Molekulargewichtes standardisiert ist, verwendet werden. Das Molekulargewicht des Sojapeptons beträgt vorzugsweise weniger als 50kD, besonders bevorzugt weniger als 10kD, insbesondere weniger als 1kD.

Als besonders vorteilhaft für die Produktivität der rekombinanten Zelllinien hat sich die Zugabe von ultrafiltriertem Sojapepton erwiesen, dessen durchschnittliches Molekulargewicht 350 Dalton beträgt (Fa. Quest). Dies ist ein Sojaisolat mit einem Gehalt an Gesamtstickstoff von ca. 9,5% und einem Gehalt an freien Aminosäuren von ca. 13%.

Besonders bevorzugt ist die Verwendung eines gereinigten, ultrafiltrierten Sojapeptons mit einem Molekulargewicht von  $\leq 1000$  Dalton, bevorzugt  $\leq 500$  Dalton, besonders bevorzugt  $\leq 350$  Dalton.

Vorzugsweise enthält das erfindungsgemäße Medium weitere Hilfssubstanzen, wie z.B. Puffer-substanzen, Oxidationsstabilisatoren, Stabilisatoren gegenüber mechanischer Beanspruchung oder Proteaseinhibitoren.

Besonders bevorzugt wird ein Medium mit folgender Zusammensetzung verwendet: synthetisches Minimalmedium (1 bis 25 g/l), Sojapepton (0,5 bis 50 g/l), L-Glutamin (0,05 bis 1 g/l),  $\text{NaHCO}_3$  (0,1 bis 10 g/l), Ascorbinsäure (0,0005 bis 0,05 g/l), Ethanolamin (0,0005 bis 0,05 g/l), Na-Selenit (1 bis 15  $\mu\text{g/l}$ ).

Dem erfindungsgemäßen Medium kann gegebenenfalls ein nichtionisches Oberflächenmittel, wie etwa Polypropylenglycol (PLURONIC F-61, PLURONIC F-68, SYNPERONIC F-68, PLURONIC F-71 oder PLURONIC F-108) als Entschäumer zugegeben werden.

Dieses Mittel wird allgemein angewendet, um die Zellen vor den negativen Auswirkungen der Belüftung zu schützen, da ohne Zugabe eines Oberflächenmittels die aufsteigenden und zerplatzen Luftblasen zur Schädigung jener Zellen führen können, die sich an der Oberfläche dieser Luftblasen befinden. ("sparging") (Murhammer und Goochee, 1990, Biotechnol.Prog. 6:142-148)

Die Menge an nichtionischem Oberflächenmittel kann dabei zwischen 0,05 und 10 g/l liegen, besonders bevorzugt ist jedoch eine möglichst geringe Menge zwischen 0,1 und 5 g/l.

Weiters kann das erfindungsgemäße Medium auch Cyclodextrin oder ein Derivat davon enthalten.

Vorzugsweise enthält das serum- und proteinfreie Medium einen Proteaseinhibitor, wie etwa Serinproteaseinhibitoren, die Gewebekultur-tauglich und synthetischen oder pflanzlichen Ursprungs sind.

Als Zellen zur Kultivierung im erfindungsgemäßen Medium werden bevorzugterweise bereits adaptierte Zellen verwendet, d.h. Zellen, die bereits an das Wachstum in protein- und serumfreien

Medien adaptiert worden sind. Es hat sich gezeigt, dass mit derartigen voradaptierten Zellen nicht nur erhöhte Ausbeuten erzielt werden können, sondern dass sich deren Stabilität bei der serum- und proteinfreien Kultivierung deutlich durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums verbessert.

5 Besonders bewährt haben sich aber erfindungsgemäß rekombinante Zellklone, die von vornherein in serum- und proteinfreien Medien für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50 Generationen stabil sind und rekombinante Produkte exprimieren.

Derartige Zellklone sind erhältlich aus einer Zellkultur, die nach Kultivierung eines rekombinanten Ursprungszellklons auf serumhaltigem Medium und Umadaptierung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium erhalten wird.

10 Unter Ursprungszellklon kann ein rekombinanter Zellklon-Transfektant verstanden werden, der nach Transfektion von Wirtszellen mit einer rekombinanten Nukleotidsequenz unter Laborbedingungen stabil rekombinantes Produkt exprimiert. Der Ursprungsklon wird zur Optimierung des Wachstums in serumhaltigem Medium angezüchtet. Zur Erhöhung der Produktivität wird der Ursprungsklon gegebenenfalls in Gegenwart eines Selektionsmittels und Selektion auf den Selektionsmarker und/oder Amplifikationsmarker angezogen. Für die großtechnische Produktion wird der Ursprungszellklon unter serumhaltigen Kultivierungsbedingungen bis zu einer hohen Zelldichte angezogen und kurz vor der Produktionsphase auf serum- und/oder proteinfreies Medium umadaptiert. Die Kultivierung erfolgt dabei vorzugsweise ohne Selektionsdruck.

20 Die Kultivierung des rekombinanten Ursprungszellklons kann bereits von Anfang an in serum- und proteinfreiem Medium erfolgen, wodurch eine Umadaptierung nicht mehr notwendig ist. Gegebenenfalls kann auch in diesem Fall ein Selektionsmittel verwendet werden und die Selektion auf den Selektions- und/oder Amplifikationsmarker erfolgen. Ein Verfahren dafür ist beispielsweise in der EP 0 711 835 beschrieben.

25 Die nach Umadaptierung auf serum- und proteinfreies Medium erhaltene Zellkultur wird auf diejenigen Zellklone der Zellpopulation getestet, die unter serum- und proteinfreien Bedingungen, gegebenenfalls in Abwesenheit eines Selektionsdruckes, stabil Produkte produzieren. Dies kann beispielsweise durch Immunfluoreszenz mit markierten, spezifischen, gegen das rekombinante Polypeptid oder Protein gerichteten Antikörpern erfolgen. Die als Produkt-Produzenten identifizierten Zellen werden aus der Zellkultur isoliert, und unter serum- und proteinfreien, vorzugsweise unter produktionsäquivalenten Bedingungen erneut vermehrt. Die Isolierung der Zellen kann dabei durch Vereinzelung der Zellen und Testen auf Produkt-Produzenten erfolgen.

30 Die Zellkultur, enthaltend die stabilen Zellen, kann erneut auf stabile rekombinante Klone getestet und diese aus der Zellkultur isoliert und auskloniert werden. Anschließend können die unter serum- und proteinfreien Bedingungen erhaltenen stabilen rekombinanten Zellklone unter serum- und proteinfreien Bedingungen weitervermehrt werden.

Die derart hergestellten im erfindungsgemäßen Medium rekombinanten Zellklone bzw. Zellpopulationen zeichnen sich insbesondere dadurch aus, daß sie in serum- und proteinfreiem Medium für mindestens 40, vorzugsweise mindestens 50, insbesondere mehr als 60 Generationen stabil sind und rekombinantes Produkt exprimieren.

40 Ein Beispiel für einen derartigen stabilen Zellklon bzw. Zellpopulation wurde unter der Nummer 98012206 bei der ECACC (UK) gemäß Budapest Vertrag hinterlegt.

Die erfindungsgemäß zu kultivierende Zellkultur ist vorzugsweise von einer rekombinanten Säugierzelle abgeleitet. Rekombinante Säugierzellen können dabei alle Zellen sein, die für ein rekombinantes Polypeptid oder Protein kodierende Sequenzen enthalten. Umfaßt sind dabei alle kontinuierlich wachsenden Zellen, die sowohl adhärent als auch nicht-adhärent wachsen. Besonders bevorzugt sind rekombinante CHO-Zellen oder BHK-Zellen. Rekombinante Polypeptide oder Proteine können Blutfaktoren, Wachstumsfaktoren oder andere biomedizinisch relevante Produkte sein.

50 Gemäß der vorliegenden Erfindung werden Zellklone bevorzugt, die die kodierende Sequenz für einen rekombinanten Blutfaktor wie Faktor II, Faktor V, Faktor VII, Faktor VIII, Faktor IX, Faktor X, Faktor XI, Protein S, Protein C, eine aktivierte Form eines dieser Faktoren, oder vWF enthalten, und in der Lage sind, diesen stabil über mehrere Generationen zu exprimieren. Besonders bevorzugt sind dabei rekombinante CHO-Zellen, die vWF oder ein Polypeptid mit vWF-Aktivität, Faktor VIII oder ein Polypeptid mit VIII-Aktivität, vWF und Faktor VIII, Faktor IX oder Faktor II exprimieren.

Um eine Masterzellbank anzulegen, werden 30 Generationen benötigt. Um eine durchschnittliche Batchkultur mit 1000 l-Maßstab durchzuführen, sind mindestens etwa 40 Generationen erforderlich. Mit dem erfindungsgemäßen Medium ist es möglich, ausgehend von einem Einzelklon eine "Master Cell Bank" (MCB), eine "Working Cell Bank" (WCB) mit etwa 8 bis 10 Generationen und damit eine Zellkultur im Produktionsmaßstab (Produktionsbiomasse) mit bis zu 20 bis 25 Generationen unter protein- und serumfreien Bedingungen herzustellen, wohingegen mit bisherigen Zellklonen und Medien einige Generationen nach Wachstum auf serum- oder proteinfreiem Medium instabil wurden, wodurch a) keine einheitliche Zellkultur mit Produkt-Produzenten und b) keine stabile Produktproduktivität über einen längeren Zeitraum möglich war.

Erfindungsgemäß konnte aber demgegenüber sogar eine erhöhte Produkt-Produktivität selbst im Vergleich zum Ursprungszellklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert wurde, gefunden werden.

Gemäß einem weiteren Aspekt betrifft die vorliegende Erfindung auch ein Verfahren von Kultivierung von Zellen, insbesondere von Säugetierzellen, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass diese Zellen in ein erfindungsgemäßes Medium eingebracht und in diesem Medium kultiviert werden.

Die vorliegende Erfindung betrifft daher auch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mediums zur Kultivierung von rekombinanten Zellen, vorzugsweise eukaryontischen Zellen, insbesondere Säugetierzellen.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist demgemäß auch eine Zellkultur, welche das erfindungsgemäße Medium und Zellen, vorzugsweise eukaryontische Zellen, insbesondere Säugetierzellen, umfasst.

Die Erfindung wird an Hand der nachfolgenden Beispiele sowie der Zeichnungsfiguren, auf die sie jedoch nicht eingeschränkt werden soll, näher erläutert.

Es zeigen:

Fig. 1: die mikroskopische Aufnahme einer Arbeitszellbank eines Ursprungszellklons zum Zeitpunkt der Umadaptierung von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium (A), nach 10 Generationen mit serum- und proteinfreiem Medium (B) und nach 60 Generationen mit serum- und proteinfreiem Medium (C);

Fig. 2: die mikroskopische Aufnahme einer Zellkultur, ausgehend von einem stabilen rekombinanten Zellklon unter serum- und proteinfreien Bedingungen auf der Stufe der Arbeitszellbank (A), nach Generationen (B) nach 60 Generationen (C);

Fig. 3: die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor

a) Faktor VIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor;

Fig. 4: einen Vergleich der Faktor VIII-Produktivität (mE/ml) bei Kultivierung im Batch-Verfahren von rFaktor VIII-exprimierenden CHO-Zellen in verschiedenen Medien;

Fig. 5: die Faktor VIII-Produktivität (E/l) bei kontinuierlichem Wachstum von rFaktor VIII-exprimierenden CHO-Zellen in serum- und proteinfreiem Medium nach Beginn der Zugabe von gereinigtem, ultrafiltriertem Sojapepton am 6. Tag der Kultivierung; und

Fig. 6: die in dem protein- und serumfreien Medium gezüchteten BHK-Zellen, enthaltend Soja-Hydrolysat.

#### Beispiele:

##### Beispiel 1:

**Stabilität von rVWF-CHO-Zellen nach Umstellen von serumhaltigem auf serum- und proteinfreies Medium**

CHO-dhfr<sup>-</sup>-Zellen wurden Plasmid phAct-rVWF und pSV-dhfr, co-transfiziert und vWF exprimierende Klone, wie in Fischer et al. (1994, FEBS Letters 351:345-348) beschrieben, subkloniert. Von den Subklonen, die stabil rVWF exprimierten, wurde unter serumhaltigen Bedingungen, jedoch in Abwesenheit von MTX, eine Arbeitszellbank (Working Cell Bank, WCB) angelegt und die Zellen

unter serumhaltigen Bedingungen auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®) immobilisiert. Nachdem eine Zelldichte von  $2 \times 10^7$  Zellen/ml Trägermatrix erreicht wurde, erfolgte die Umstellung der Zellen auf serum- und proteinfreies Medium. Die Zellen wurden für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte bei der Arbeitszellbank vor der Mediumsumstellung, nach 10 und 60 Generationen im serum- und proteinfreien Medium. Während die Arbeitszellbank noch 100% rVWF-Produzenten aufwies (Figur 1 A), sank der Anteil der rVWF-Produzenten nach 10 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium auf etwa 50% ab (Figur 1 B). Nach 60 Generationen wurden mehr als 95% der Zellen als Nicht-Produzenten identifiziert (Figur 1 C).

### Beispiel 2: Klonierung von stabilen rekombinanten CHO-Klonen

Von der Zellkultur, enthaltend rVWF-CHO-Zellen gemäß Beispiel 1 (dieser mit r-VWF-CHO F7 bezeichnete stabile Zellklon wurde bei der ECACC (European Collection of Cell Cultures), Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK, gemäß Budapest Vertrag am 22. Jänner 1998 hinterlegt und erhielt die Hinterlegungsnummer 98012206), die für 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium kultiviert worden war (Figur 1 C), wurde eine Verdünnung angelegt und jeweils 0,1 Zellen/well einer Mikrotiterplatte ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM/HAM's F12 ohne Serum- oder Proteinzusätze und ohne Selektionsdruck für etwa 3 Wochen kultiviert und die Zellen mit Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern getestet. Ein als positiv identifizierter Zellklon wurde als Ausgangsklon für die Herstellung einer Saat-Zellbank eingesetzt. Von der Saat-Zellbank wurde eine Master-Zellbank (MCB) in serum- und proteinfreiem Medium angelegt und Einzelampullen für die weitere Herstellung einer Arbeitszellbank weggefroren. Ausgehend von einer Einzelampulle wurde eine Arbeitszellbank in serum- und proteinfreiem Medium hergestellt. Die Zellen wurden auf poröse Mikroträger immobilisiert und für mehrere Generationen unter serum- und proteinfreien Bedingungen weiterkultiviert. Mittels Immunfluoreszenz mit markierten anti-vWF-Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten in serum- und proteinfreiem Medium auf Produktivität getestet. Die Bewertung der Stabilität der Zellen erfolgte auf der Stufe der Arbeitszellbank und nach 10 und 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium. Sowohl auf Stufe der Arbeitszellbank (Figur 2 A), als auch nach 10 (Figur 2 B) und 60 Generationen (Figur 2 C) wurden annähernd 100% der Zellen als positive stabile rekombinante Klone identifiziert, die rVWF exprimieren.

### Beispiel 3: Zellspezifische Produktivität der rekombinanten Zellklone

Von definierten Stufen während der Kultivierung von rekombinanten Zellen wurde eine definierte Zellzahl entnommen und mit frischem Medium für 24 h inkubiert. Die rVWF:Risto-CoF-Aktivität wurde in den Zellkulturüberständen bestimmt. Tabelle 1 zeigt, daß die zellspezifische Produktivität bei den erfindungsgemäßen stabilen rekombinanten Zellklonen auch nach 60 Generationen in serum- und proteinfreiem Medium stabil war, und sogar im Vergleich zum Ursprungsklon, der in serumhaltigem Medium kultiviert war, erhöht war.

**Tabelle 1**

Zellklon	zellspezifische Produktivität der Arbeitszellen mU rVWF/ $10^6$ Zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 10 Generationen mU rVWF/ $10^6$ Zellen/Tag	zellspezifische Produktivität nach 60 Generationen mU rVWF/ $10^6$ Zellen/Tag
rVWF-CHO #808.88 Ursprungszellklon	55	30	< 10
r-vWF-CHO F7 *) stabiler Klone	62	65	60



\*) hinterlegt am 22.1.1998 (ECACC (European Collection of Cell Cultures, Salisbury, Wiltshire SP4 0JG, UK); Hinterlegungsnummer 98012208)

**Beispiel 4:**

**Zusammensetzung eines synthetischen serum- und proteinfreien Mediums**

**Tabelle 2**

Komponente	g/l	Bevorzugte Menge in g/l
Synthetisches Minimalmedium (DMEM/HAM's F12)	1 - 100	11,00 - 12,00
Sojapepton	0,5 - 50	2,5
L-Glutamin	0,05 - 1	0,38
NaHCO <sub>3</sub>	0,1 - 10	2,00
Ascorbinsäure	0,0005 - 0,05	0,0035
Ethanolamin	0,0005 - 0,05	0,0015
Na-Selenit	1 - 15 µg/l	8,6 µg/l
optional: Synperonic F68	0,01 - 10	0,25

**Beispiel 5:**

**Kultivierung von rFVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Minimalmedium**

Eine Zellkultur, enthaltend rFVIII-CHO-Zellen, wurde in einem 10 l-Röhrtank und Perfusion kultiviert. Dabei wurde ein Medium gemäß Beispiel 4 verwendet. Die Zellen wurden dabei auf einem porösen Mikroträger (Cytopore®, Pharmacia) immobilisiert und für mindestens 6 Wochen kultiviert. Die Perfusionsrate betrug 4 Volumenwechsel/Tag, der pH-Wert lag bei 6,9-7,2, die O<sub>2</sub>-Konzentration bei etwa 20-50% und die Temperatur bei 37°C.

Figur 3 zeigt die Ergebnisse der Kultivierung eines rFVIII-CHO-Zellklons in einem 10 l-Perfusionsbioreaktor.

a) Faktor VIII-Aktivität (mEinheiten/ml) und Perfusionsrate (1-5/Tag) über einen Zeitraum von 42 Tagen.

b) Volumetrische Produktivität (Einheiten Faktor VIII/l/Tag) im Perfusionsbioreaktor.

**Tabelle 3**

Kultivierungstage	Zellspezifische Produktivität (mE/10 <sup>6</sup> Zellen/Tag)	Immunfluoreszenz (% FVIII-positive Zellen)
15	702	n.a.
21	1125	n.a.
28	951	> 95%
35	691	> 95%
42	970	n.a.

Tabelle 3 zeigt die Stabilität und spezifische Produktivität der rFVIII exprimierenden Zellen. Für diese Ergebnisse wurden nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen Proben entnommen, bei 300 g abzentrifugiert und in frischem serum- und proteinfreiem Medium resuspendiert. Nach weiteren 24 Stunden wurde die Faktor VIII-Konzentration in den Zellkulturüberständen und die Zellzahl bestimmt. Ausgehend von diesen Daten wurde die spezifische FVIII-Produktivität berechnet.

Es wurde eine stabile durchschnittliche Produktivität von 888 mEinheiten/10<sup>6</sup>-Zellen/Tag erreicht. Diese stabile Produktivität wurde auch durch Immunfluoreszenz mit markierten anti-FVIII-

Antikörpern nach 15, 21, 28, 35 und 42 Tagen in serum- und proteinfreiem Medium bestätigt.

**Beispiel 6:**

**Vergleich der Produktivität von rekombinanten FVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Medium, enthaltend weitere Medienkomponenten.**

Eine rFVIII-CHO-Zellen enthaltende Zellkultur wurde im Batch-Ansatz kultiviert. Dabei wurde ein Medium gemäß Beispiel 4 verwendet, dem folgende Aminosäuren zugegeben wurden:

**Tabelle 4**

Aminosäure:	mg/l	Bevorzugte Menge in mg/l
L-Asparagin	1 - 100	20
L-Cystein.HCl.H <sub>2</sub> O	1 - 100	15
L-Cystin	1 - 100	20
L-Prolin	1 - 150	35
L-Tryptophan	1 - 100	20
L-Glutamin	50 - 1000	240

Die Zellen wurden bei 37°C gezüchtet, pH 6,9-7,2. Die Zellen wurden im Batch-Verfahren über 24-72 Stunden gezüchtet.

Die Produktivität der rekombinanten FVIII-CHO-Zellen wurde in folgenden Medienzusammensetzungen gemessen:

Mix 1 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium ohne Sojapepton, enthaltend zusätzlich eine Aminosäuremischung gemäß der oben genannten Tabelle.

Mix 2 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium, enthaltend Sojapepton.

Mix 3 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium, enthaltend Sojapepton und zusätzlich eine Aminosäuremischung gemäß der oben genannten Tabelle.

Mix 4 bestehend aus serum- und proteinfreiem Medium, enthaltend zusätzlich eine Aminosäuremischung gemäß der oben genannten Tabelle und 2,5 g/l gereinigtes, ultrafiltriertes Sojapepton. Die Reinigung des ultrafiltrierten Sojapepton erfolgte chromatographisch über eine Sephadex®-Säule.

**Beispiel 7:**

**Kultivierung von rekombinanten FVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Medium in Chemostat-Kultur.**

Eine rFVIII-CHO-Zellen enthaltende Zellkultur wurde in einem 10 l gerührten Bioreaktor-Tank kultiviert. Dabei wurde ein Medium gemäß Beispiel 4, ohne Sojapepton, enthaltend eine Aminosäuremischung gemäß Beispiel 6 verwendet. Die Zellen wurden bei 37°C gezüchtet, pH 6,9-7,2; die Sauerstoffkonzentration lag bei 20-50% Luftsättigung. Zur Bestimmung des Faktor VIII-Titers und der Zellkonzentration im Kulturüberstand wurden alle 24 Stunden Proben entnommen. Die Gesamt-Zellkonzentration war vom 2. bis zum 14. Tag konstant. Ab dem 6. Tag wurde dem Medium ultrafiltriertes Sojapepton zugegeben. Die Faktor VIII-Produktivität ist in Figur 5 dargestellt, die Messung erfolgte mittels eines CHROMOGENIX CoA FVIII:C/4-Systems. Immunfluoreszenz mit markierten anti-FVIII-Antikörpern. Den Daten ist zu entnehmen, dass es durch Zugabe des Sojapeptons zu einem deutlichen Anstieg der Faktor VIII-Produktivität und damit der volumetrischen Produktivität des Bioreaktor-Systems kommt, ohne zu einem deutlichen Anstieg des Zellwachstums zu führen. Das Fehlen von Sojapepton in der kontinuierlichen Kultur führt nach wenigen Tagen zu einem deutlichen Abfall der Faktor VIII-Produktivität, während die Zugabe des Sojapeptons einen fast 10-fachen Anstieg der Produktivität zu Folge hat. Da diese Zugabe jedoch nicht die Zellzahl erhöht, ist damit deutlich gezeigt, daß ultrafiltriertes Sojapepton eine deutliche Steigerung der Produktivität zur Folge hat, die aber unabhängig ist vom Zellwachstum.

**Beispiel 8:**

**Vergleich der Wachstumsrate und der Produktivität von rekombinanten FVIII-CHO-Zellen in protein- und serumfreiem Medium, enthaltend unterschiedliche Hydrolysate.**

5 Eine rFVIII-CHO-Zellkultur wurde im Batch-Ansatz kultiviert. Dabei wurde ein serum- und proteinfreies Medium verwendet wie in Beispiel 4 beschrieben, dem unterschiedliche Hydrolysate (aus Soja, Hefe, Reis, Weizen) zugegeben wurden. Als Kontrolle wird ein serum- und proteinfreies Medium verwendet, dem kein Hydrolysat zugegeben wurde.

10 Die Ausgangszell-dichte betrug  $0,6 \times 10^5$  bzw.  $0,4 \times 10^6$  Zellen. Die Zellen wurden bei  $37^\circ\text{C}$  im Batch-Verfahren gezüchtet, pH 6,9-7,2.

Tabelle 5: zeigt die Ergebnisse der Kultivierungsversuche von rFVIII-CHO-Zellen in serum- und proteinfreiem Medium, dem Soja-(ultrafiltriert) und Hefe-Hydrolysate zugegeben wurden. Die Ausgangszell-dichte betrug  $0,6 \times 10^5$  Zellen. Als Kontrolle wurde serum- und proteinfreies Medium ohne Hydrolysat-Zusätze verwendet.

**Tabelle 5**

Hydrolysat	End-Zell-dichte ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	FVIII-Titer (mE/ml)	FVIII-Clotting- Aktivität (mE/ml)
Soja	3,6	485	508
Hefe	3,3	226	230

25 Tabelle 6: zeigt die Ergebnisse der Kultivierungsversuche von rFVIII-CHO-Zellen in serum- und proteinfreiem Medium, dem Soja-(ultrafiltriert), Reis- und Weizen-Hydrolysate zugegeben wurden. Die Ausgangszell-dichte betrug  $0,6 \times 10^5$  Zellen. Als Kontrolle wurde serum- und proteinfreies Medium ohne Hydrolysat-Zusätze verwendet.

**Tabelle 6**

Hydrolysat	End-Zell-dichte ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	FVIII-Titer (mE/ml)	vWF-Antigen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Soja	3,7	1142	6,7
Reis	3,0	479	3,2
Weizen	3,4	522	3,9
Kontrolle	3,0	406	3,1

40 Tabelle 7: zeigt die Ergebnisse der Kultivierungsversuche von rFVIII-CHO-Zellen in serum- und proteinfreiem Medium, dem Soja-(ultrafiltriert) und Weizen-Hydrolysate zugegeben wurden. Die Ausgangszell-dichte betrug  $0,4 \times 10^6$  Zellen.

**Tabelle 7**

Hydrolysat	End-Zell-dichte ( $\times 10^6/\text{ml}$ )	FVIII-Titer (mE/ml)	FVIII-Anti- gen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	vWF-Anti- gen ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )
Soja	1,6	1427	166	17,2
Weizen	1,0	1120	92	7,9

**Beispiel 9:**

**Kultivierung von BHK-Zellen in protein- und serumfreiem Medium enthaltend Soja-Hydrolysat**

55 BHK-21 (ATCC CCL 10)-Zellen wurden mittels eines  $\text{CaPO}_4$ -Verfahrens dreifach co-transfi-

ziert mit folgenden Plasmiden: 25 µg des Plasmids pSV-FII (Fischer B. et al., J.Biol.Chem., 1996, Vol. 271, pp. 23737-23742), das humane Faktor II (Prothrombin)- cDNA unter der Kontrolle eines SV40-Promotors (SV40 early gene Promoter) enthält; 4 µg des Plasmids pSV-DHFR für die Methotrexat-Resistenz und 1 µg des Plasmids pUCSV-neo (Schlokot U. et al., Biotech.Appl.Biochem., 1996, Vol. 24, pp. 257-267), das die G418/Neomycin-Resistenz vermittelt. Stabile Zellklone wurden durch Kultivierung in einem Medium, das 500 µg/ml G418 enthielt und durch schrittweise Erhöhung der Methotrexat-Konzentration bis zu einer Konzentration von 3 µM selektiert.

Die so erhaltenen Klone wurden subkloniert und auf protein- und serumfreies Medium adaptiert. Die Kultivierung erfolgte in Suspensionskultur.

Die Ergebnisse sind der Figur 6 zu entnehmen; die in dem protein- und serumfreien Medium, enthaltend Soja-Hydrolysat, gezüchteten BHK-Zellen zeigten eine hohe und stabile Produktionsrate von rekombinantem Faktor II.

## PATENTANSPRÜCHE:

1. Medium zur protein- und serumfreien Kultivierung von Zellen, insbesondere Säugetierzellen, dadurch gekennzeichnet, dass es einen Anteil an Soja-Hydrolysat mit einem Molekulargewicht  $\leq 500$  Dalton enthält.
2. Medium nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es eine Menge von mehr als 10 Gew.-% Soja-Hydrolysat bezogen auf die Gesamt-Trockenmasse des Mediums enthält.
3. Medium nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es eine gereinigte Präparation eines Soja-Hydrolysats enthält.
4. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es ein ultrafiltriertes Soja-Hydrolysat enthält.
5. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Soja-Hydrolysat einen Endotoxin-Gehalt von  $< 500$  E/g aufweist und dass mindestens 40% des Soja-Hydrolysats ein Molekulargewicht von 200-500 Dalton aufweisen.
6. Medium nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 50 % des Soja-Hydrolysats ein Molekulargewicht von 200-500 Dalton aufweisen.
7. Medium nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 55 % des Soja-Hydrolysats ein Molekulargewicht von 200-500 Dalton aufweisen.
8. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass es weiters Aminosäuren, vorzugsweise ausgewählt aus L-Asparagin, L-Cystein, L-Cystin, L-Prolin, L-Tryptophan, L-Glutamin oder Mischungen davon, enthält.
9. Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass es weiters Hilfssubstanzen, vorzugsweise Puffersubstanzen, Oxidationsstabilisatoren, Stabilisatoren gegenüber mechanischer Beanspruchung oder Proteaseinhibitoren enthält.
10. Verfahren zur Kultivierung von Zellen, insbesondere Säugetierzellen, dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen in ein Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 9 eingebracht und kultiviert werden.
11. Verwendung eines Mediums nach einem der Ansprüche 1 bis 9 zur Kultivierung von rekombinanten Zellen, insbesondere Säugetierzellen.
12. Zellkultur, umfassend Zellen, insbesondere Säugetierzellen, und ein Medium nach einem der Ansprüche 1 bis 9.

## HIEZU 6 BLATT ZEICHNUNGEN

FIG. 1

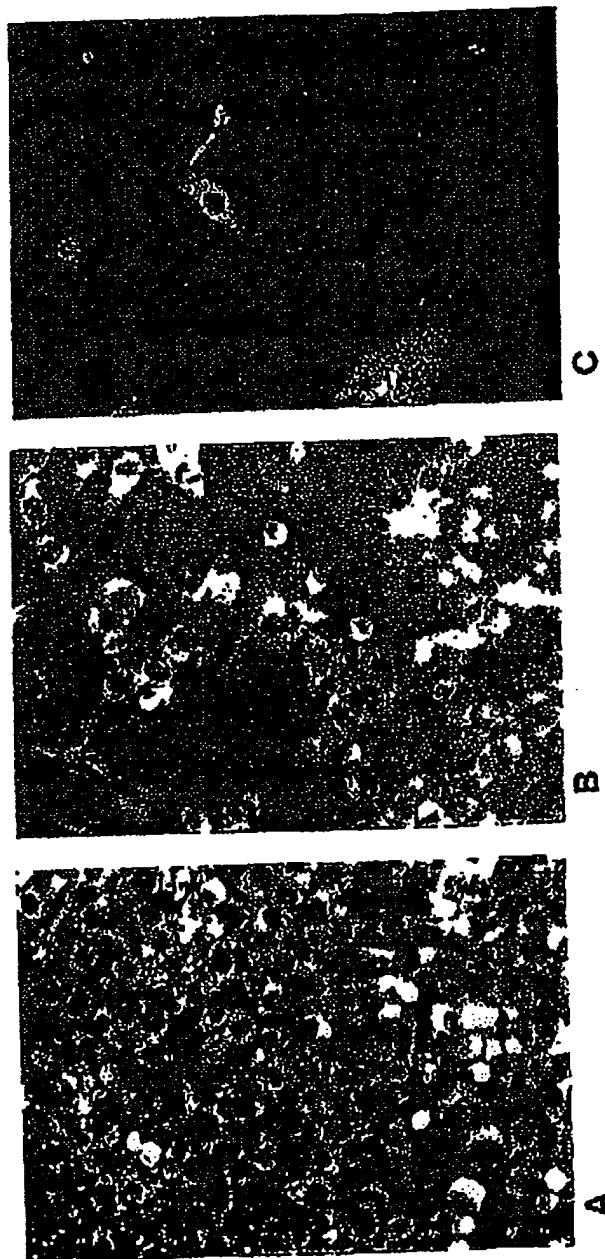
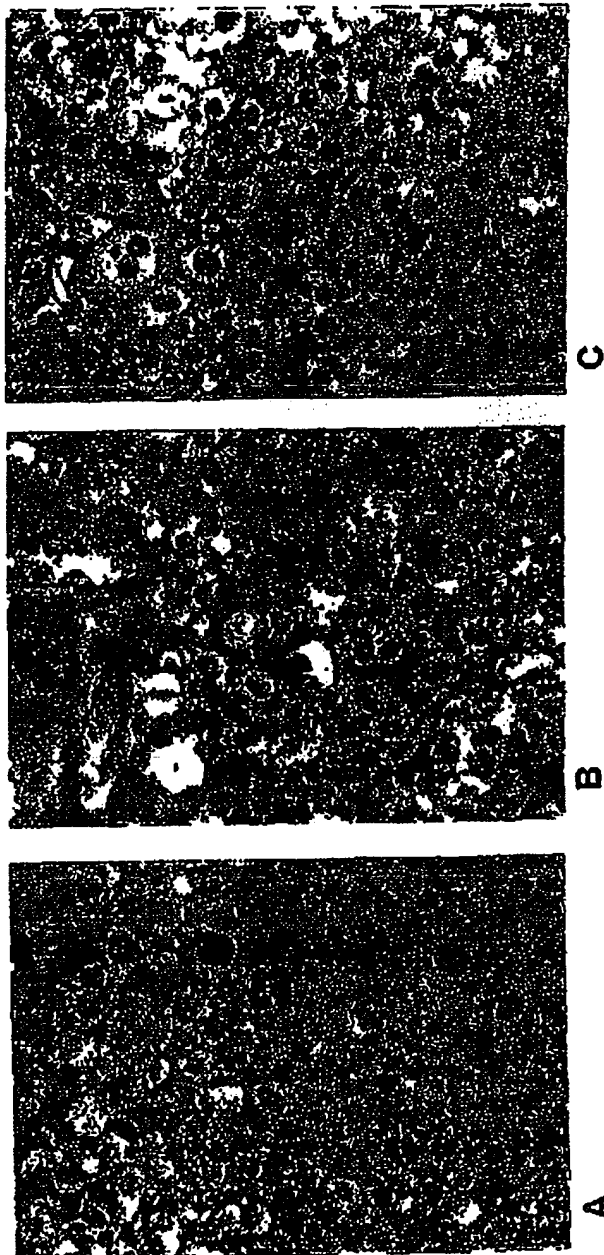


FIG. 2



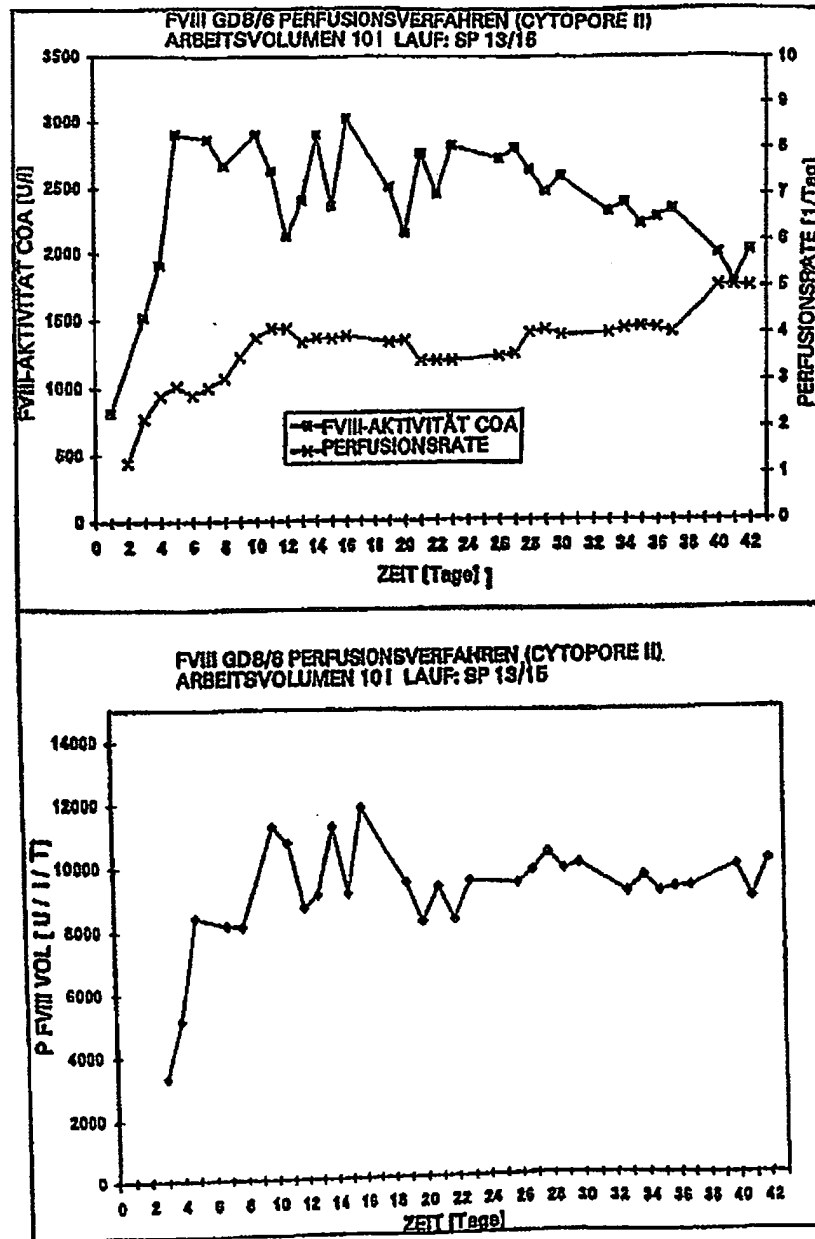


FIG. 3

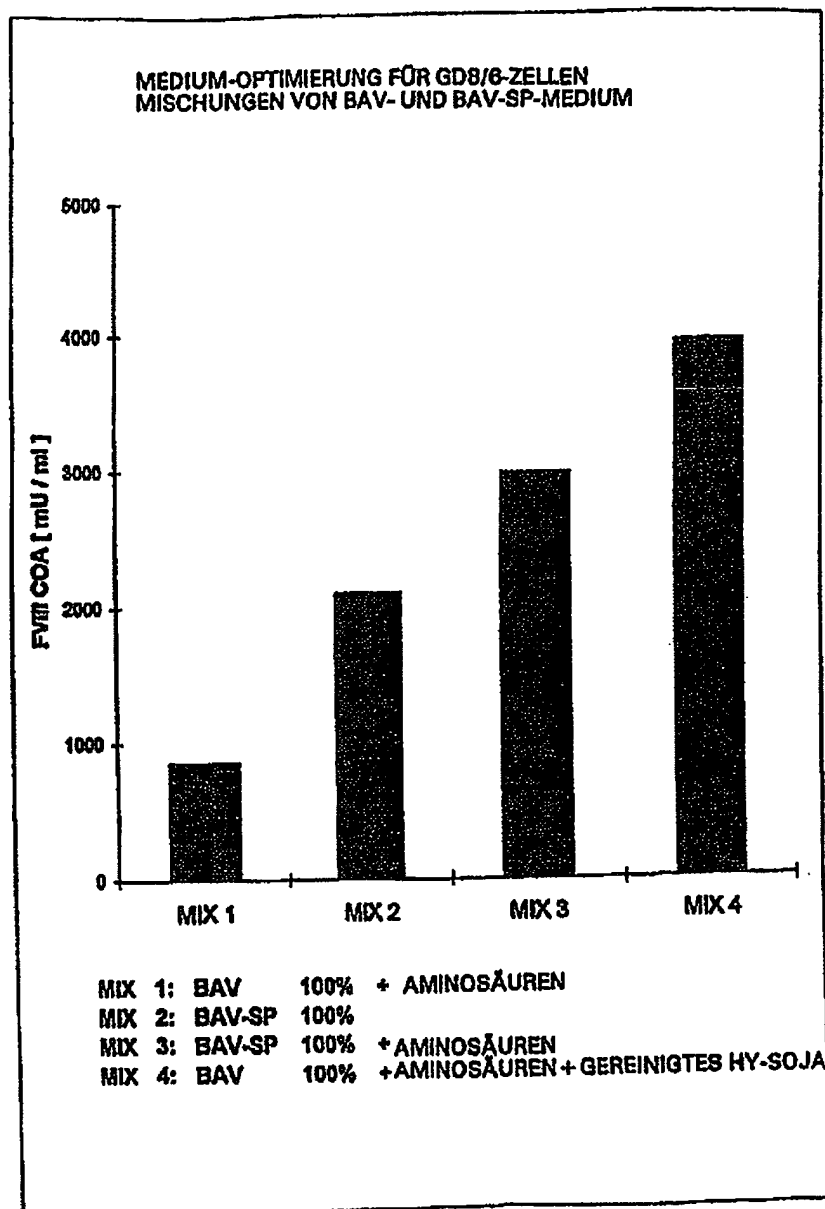


FIG. 4



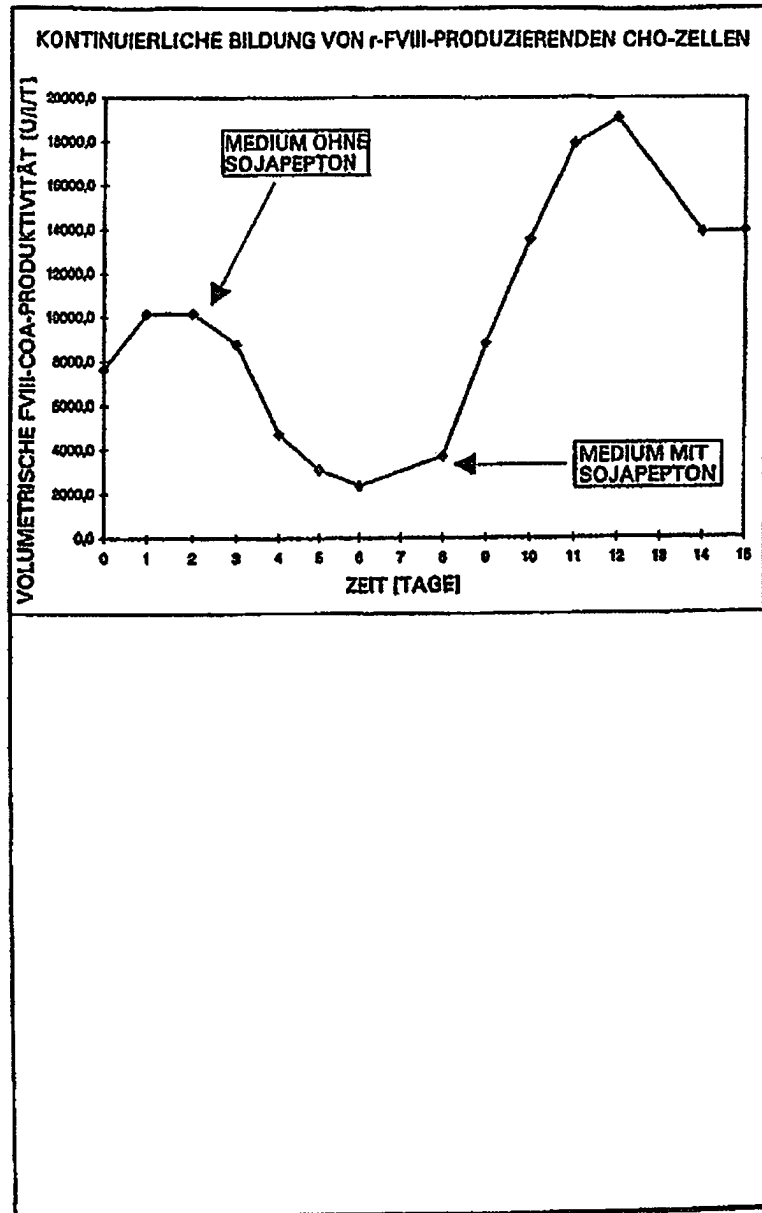


FIG. 5

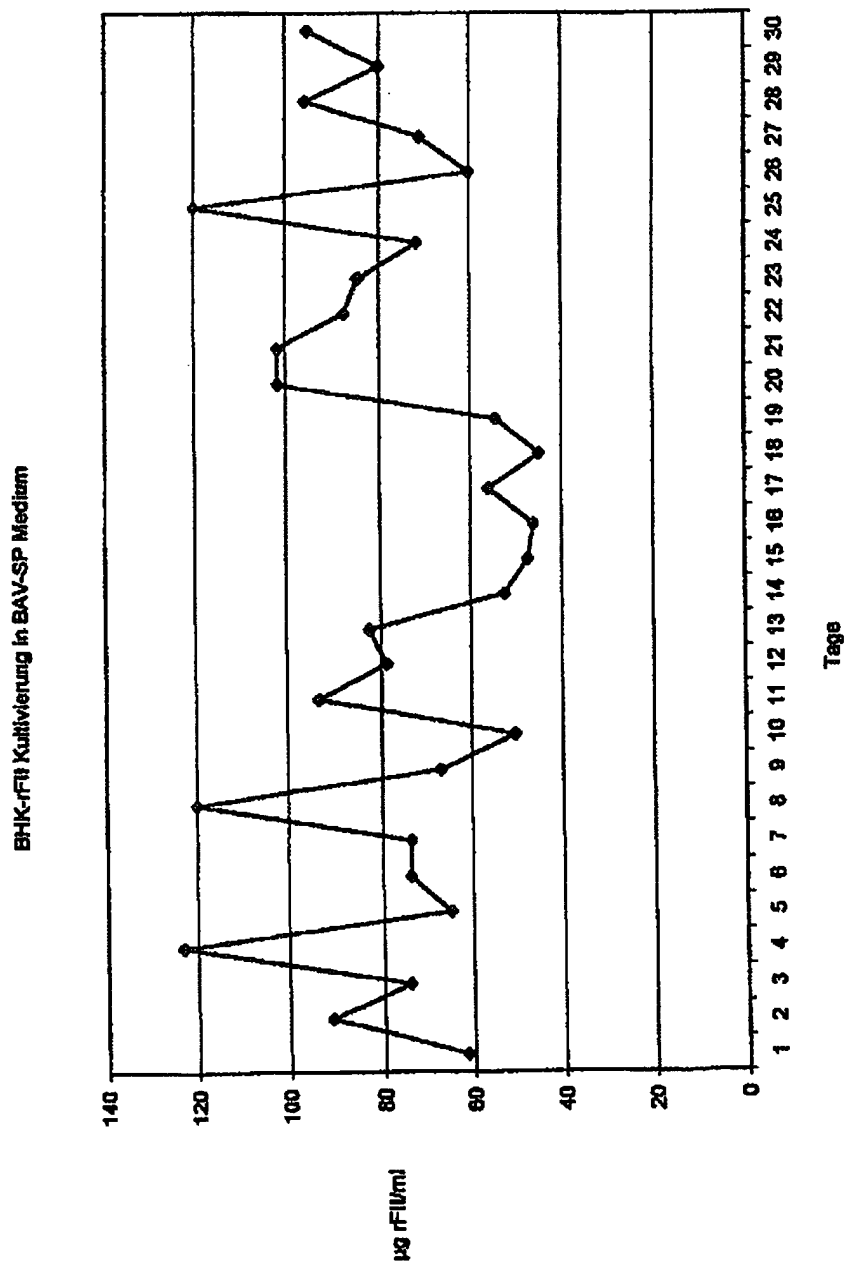


FIG. 6